

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08187094 A**

(43) Date of publication of application: **23.07.96**

(51) Int. Cl

C12P 21/02

C07K 19/00

C12N 9/52

C12N 15/09

**/(C12P 21/02 , C12R 1:19), (C12N 9/52
 , C12R 1:19), (C12N 15/09 , C12R 1:445
)**

(21) Application number: **07254537**

(22) Date of filing: **07.09.95**

(30) Priority: **07.09.94 JP 06238595**
07.11.94 JP 06296028

(71) Applicant: **SUNTORY LTD**

(72) Inventor: **YABUTA MASAYUKI**
OOSUE KAZUHIRO

(54) PRODUCTION OF PROTEIN

(57) Abstract:

PURPOSE: To efficiently obtain the objective protein by transforming a host cell with an expression vector containing a gene of a fused protein comprising a protective polypeptide and an object polypeptide, manifesting the gene and cutting with an endogenous protease of the host.

CONSTITUTION: A host cell (e.g.; Escherichia coli) is transformed by an expression vector integrated a gene coding fused protein expressed by the formula: A-L-B (A is a protective polypeptide; B is the object polypeptide; L is a linker peptide having a substrate specifically recognized by an endogenous protease of a host cell) or the formula: A-L-B-L-C (C is a protective peptide) and comprising a protective polypeptide and the object polypeptide, cultured and a gene is manifested, the cell is crushed and the fused protein is separated, then the

fused protein is solubilized and the linker peptide is cut with the endogenous protease of the host cell (e.g.; Escherichia coli ompT protease), thus the object polypeptide is efficiently obtained from the fused protein.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-187094

(43) 公開日 平成8年(1996)7月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02	C			
C 0 7 K 19/00		8318-4H		
C 1 2 N 9/52		9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数34 F D (全 26 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-254537

(22) 出願日 平成7年(1995)9月7日

(31) 優先権主張番号 特願平6-238595

(32) 優先日 平6(1994)9月7日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平6-296028

(32) 優先日 平6(1994)11月7日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72) 発明者 篠田 雅之

群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ
2716番地1 サントリー株式会社医薬セン
ター内

(72) 発明者 大末 和廣

群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ
2716番地1 サントリー株式会社医薬セン
ター内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

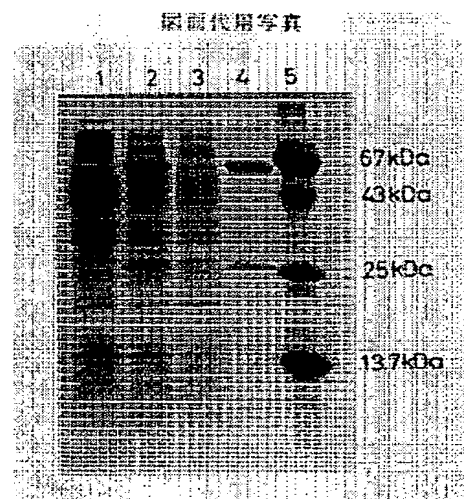
(54) 【発明の名称】 蛋白の製造方法

(57) 【要約】

【目的】 目的とするポリペプチドを融合蛋白質として生成せしめ、宿主由来のプロテアーゼにより融合体から目的ポリペプチドを単離するための新規な方法の提供。

【構成】 目的ポリペプチドが封入体を形成しにくい場合、例えば該目的ポリペプチドのN-末端側及びC-末端側の両方に保護ポリペプチドを付加して融合蛋白質にすることによって封入体を形成せしめ、該融合蛋白質を単離・可溶化することにより随伴する宿主由来のプロテアーゼにより切断し、目的ポリペプチドを採取する。

【効果】 目的ポリペプチドを効率よく単離・精製することができる。



V8D融合蛋白質の発現

1. 誘導前の総蛋白質
2. 誘導後の総蛋白質
3. 誘導後の可溶性成分の蛋白質
4. 誘導後の不溶性成分の蛋白質
5. 分子量マーカー

【特許請求の範囲】

【請求項1】 保護ポリペプチド及び目的ポリペプチドからなる融合蛋白をコードする遺伝子を有する発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、当該遺伝子を発現させ、当該宿主細胞の内在性プロテアーゼにより当該融合蛋白より目的ポリペプチドを切断して得ることを特徴とする目的ポリペプチドの製造方法。

【請求項2】 融合蛋白が式(1) A-L-B、又は式(2) A-L-B-L-C (A及びCは保護ポリペプチド、Bは目的ポリペプチド、Lは宿主細胞内在性プロテアーゼが特異的に認識する基質を有するリンカーペプチドを示す) で示され、当該融合蛋白をリンカーペプチドLの領域で切断して当該融合蛋白から目的ポリペプチドBを得ることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 目的ポリペプチドを不活性型の融合蛋白として宿主細胞内に発現させ、当該細胞を破碎し、当該融合蛋白を分離した後、当該融合蛋白を可溶化する変性剤により融合蛋白を可溶化し、その後、リンカーペプチドL領域を宿主細胞内在性プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得ることを特徴とする請求項1～2のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項4】 目的ポリペプチドを不活性型の融合蛋白として宿主細胞内に発現させ、当該細胞を破碎し融合蛋白を分離した後、当該融合蛋白を可溶化する変性剤により融合蛋白を可溶化し、その後、当該変性剤の濃度を下げてリンカーペプチドLを宿主細胞内在性プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得ることを特徴とする請求項3記載の製造方法。

【請求項5】 宿主細胞内在性プロテアーゼと融合蛋白が菌体破碎後の分離操作において同じ画分に存在することを特徴とする請求項1～4記載の製造方法。

【請求項6】 宿主細胞内在性プロテアーゼが大腸菌ompIプロテアーゼであることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項7】 融合蛋白を可溶化する変性剤が尿素、塩酸グアニジンまたは界面活性剤であることを特徴とする請求項3～6のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項8】 融合蛋白を可溶化する変性剤が尿素であり、尿素濃度が1～6Mであることを特徴とする請求項7記載の製造方法。

【請求項9】 宿主細胞内在性プロテアーゼが大腸菌ompIプロテアーゼであり、当該酵素を用いて融合蛋白を切断させるときの溶液中の尿素濃度が1～6Mであることを特徴とする請求項3～8のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項10】 リンカーペプチドが、目的ポリペプチドの発現ベクターを有する宿主細胞の内在性プロテアーゼにより特異的に認識される部位を有するリンカーペプチドであることを特徴とする請求項2～9のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項11】 リンカーペプチドが、1乃至2塩基性アミノ酸対を当該リンカーペプチド中に含み、且つ当該リンカーペプチドが2～50のアミノ酸残基からなるペプチドであることを特徴とする請求項2～10のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項12】 リンカーペプチドが、1乃至2塩基性アミノ酸対を当該リンカーペプチドのN末端部及び／又はC末端部に含むことを特徴とする請求項2～11のいずれか1項に記載の製造方法。

10 【請求項13】 リンカーペプチドが、アミノ酸配列RL YRRHRWGRSGSPLRAHE (配列番号: 1) を有することを特徴とする請求項11又は12記載の製造方法。

【請求項14】 保護ポリペプチドが、大腸菌β-ガラクトシダーゼ由来ポリペプチド及び／又はトランスポゾン903由来のアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ由来ポリペプチドであることを特徴とする請求項1～13のいずれか1項に記載の製造方法。

20 【請求項15】 保護ポリペプチドAが、大腸菌β-ガラクトシダーゼ由来ポリペプチドであり、保護ポリペプチドCがトランスポゾン903由来のアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ由来ポリペプチドであることを特徴とする請求項2～14のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項16】 目的ポリペプチドの製造法であって、以下の製造工程；

(1) 当該目的ポリペプチドが活性型となるようにリフォールディングを生じさせる工程、が加わることを特徴とする請求項1～15のいずれか1項に記載の製造方法。

30 【請求項17】 変性剤存在下でompIプロテアーゼにより切断された目的ポリペプチドを、当該変性剤の濃度を下げることにリフォールディングを生じさせ、活性型の目的ポリペプチドを得ることを特徴とする請求項6～16のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項18】 目的ポリペプチドが、20～800のアミノ酸残基からなることを特徴とする請求項1～17のいずれか1項に記載の製造方法。

40 【請求項19】 目的ポリペプチドが生理活性ポリペプチドであることを特徴とする請求項1～18記載の製造方法。

【請求項20】 前記生理活性ポリペプチドがモチリン、グルカゴン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、セクレチン、成長ホルモン、インシュリン、成長ホルモン分泌ホルモン、パゾプレッシン、オキシトシン、ガストリン、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド(GLP-2)、グルカゴン様ペプチド(7-36アミド)、コレシストキニン、バソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド(vasoactive intestinal polypeptide ; VIP)、下垂体アデノレートサイクラーゼ活性化ポリペプチド(Pi

luitary adenohypophyseal cyclase activating polypeptide)、ガストリン放出ホルモン、ガラニン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH、PTH(1-34)、PTH(1-84))、ペプチド・ヒスチジン・イソロイシン(peptide histidine isoleucine; PHI)、ニューロペプチドY(neuropeptide Y)、ペプチドYY(peptide YY)、パankレアチック・ポリペプチド(pancreatic polypeptide)、ソマトスタチン、TGF- α 、TGF- β 、神経成長因子、繊維芽細胞成長因子、リラキシン、プロラクチン、利尿性ペプチド、アンジオテンシン、脳由来神経栄養因子(BDNF)、又はKEX2エンドプロテアーゼである、請求項19に記載の方法。

【請求項21】 前記利尿性ペプチドがANP、BNP又はCNPである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 目的ポリペプチドが酵素であることを特徴とする請求項19記載の製造方法。

【請求項23】 目的ポリペプチドが蛋白質分解酵素であることを特徴とする請求項22記載の製造方法。

【請求項24】 前記酵素がKEX2エンドプロテアーゼ又は当該プロテアーゼ誘導体である請求項23に記載の方法。

【請求項25】 目的ポリペプチドが、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ又は当該プロテアーゼ誘導体であることを特徴とする請求項23に記載の製造方法。

【請求項26】 目的ポリペプチドが、図4もしくは図6の下線部で示されるアミノ酸配列又は図14に記載されるアミノ酸配列を有するスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ誘導体であることを特徴とする請求項25記載の製造方法。

【請求項27】 遺伝子組換え技術を用いた目的ポリペプチドの製造法であって、以下の製造工程；

(1) 融合蛋白が保護ポリペプチド、目的ポリペプチド及びリンカーペプチドからなり、当該保護ポリペプチドが大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ由来ポリペプチド及び/又はトランスポゾン903由来のアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ由来ポリペプチドであり、当該目的ポリペプチドがスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ誘導体であり、当該保護ポリペプチドと当該目的ポリペプチドの間の当該リンカーペプチド領域が宿主細胞内在性プロテアーゼにより特異的に認識される基質を有するリンカーペプチド領域である、当該融合蛋白をコードする遺伝子を有する発現ベクターにより宿主細胞である大腸菌を形質転換し、(2) スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ誘導体が大腸菌の形質転換した状態で当該融合蛋白を大腸菌内で発現させ、

(3) 当該菌体を破碎し、当該融合蛋白を分離した後、菌体内在性プロテアーゼである大腸菌ompIプロテアーゼ

と当該融合蛋白が存在する画分を得、(4) 当該融合蛋白を変性剤により可溶化し、(5) 可溶化後、大腸菌ompIプロテアーゼの活性が発現する状態まで変性剤の濃度を下げて、上記リンカーペプチド領域を当該プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得る工程、を含んでなることを特徴とする目的ポリペプチドの製造法。

【請求項28】 融合蛋白を可溶化する変性剤が尿素、塩酸グアニジンまたは界面活性剤であることを特徴とする請求項27記載の方法。

【請求項29】 融合蛋白を可溶化する変性剤が尿素であり、尿素濃度が1-8Mであることを特徴とする請求項28記載の製造方法。

【請求項30】 大腸菌ompIプロテアーゼによるプロセッシング工程時の尿素濃度が約4Mであることを特徴とする請求項27-29のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項31】 リンカーペプチドが、2塩基性アミノ酸対を当該リンカーペプチドのN末端及びC末端、または当該リンカーペプチド中に含み、且つ当該リンカーペプチドが2-50のアミノ酸残基からなるペプチドであることを特徴とする請求項27-30のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項32】 リンカーペプチドが、アミノ酸配列RLYRRHHRWGSGSPLRAHE(配列番号: 1)を有することを特徴とする請求項27-31記載の製造方法。

【請求項33】 目的ポリペプチドが、図4もしくは図6の下線部で示されるアミノ酸配列又は図14に記載されるアミノ酸配列を有するスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ誘導体の何れかであることを特徴とする請求項27乃至請求項32記載の製造方法。

【請求項34】 遺伝子組換え技術を用いた目的ポリペプチドの製造法であって、以下の製造工程；

(1) 当該目的ポリペプチドが活性型となるようにリフォールディングを生じさせる工程、が加わることを特徴とする請求項27-33のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子組換え技術を用いた目的ポリペプチドの製造方法に関する。好ましくは、目的ポリペプチドは生理活性ポリペプチドであり、例えばプロテアーゼのごとき酵素である。一例として、目的ポリペプチドがスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ誘導体である当該ポリペプチドの製造方法に関する。

【0002】 さらに具体的な一例としては、大腸菌発現系を用いてスタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*) V8株由来のV8プロテアーゼ誘導体を不溶性の融合蛋白として発現させ、変性剤の存在下に大

5

腸菌由来の内在性のomp⁺プロテアーゼにより、当該融合蛋白からV8プロテアーゼ誘導体を切断し、必要であればリフォールディングを経て、活性型のV8プロテアーゼ誘導体を製造する方法である。

【0003】

【従来の技術】スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) (以下S. アウレウス (*S. aureus*)) V8プロテアーゼは*S. aureus* V8株が培地中に分泌するセリンプロテアーゼの一種である。この酵素は、1972年にDrapeau, G. R. 等により*S. aureus* V8株の培地中に分泌されるグルタミン酸およびアスパラギン酸のC末端側を特異的に切断するセリンプロテアーゼの一種として単離精製され (Jean Houmard and Gabriel R. Drapeau (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509)、1987年にはCynthia Carmona 等により本酵素のDNA塩基配列が明らかになっている (Cynthia Carmona and Gregory L. Gray (1987) Nucleic Acids Res. 15, 6757)。

【0004】本酵素は336個のアミノ酸残基からなる前駆体として発現されたのちN末端から68個のプレプロ配列が除去され成熟蛋白として分泌されると考えられている。さらに、本酵素にはそのC末端領域 (アミノ酸番号221-256) にプロリン-アスパラギン酸-アスパラギンのリピート (繰り返し) 配列が存在していることが知られている。この繰り返し配列が酵素活性に必要であるか否かについては不明であり、Gray等はこの酵素が分泌される前に不活性型の酵素として存在する際に機能しているのではないかと考えている。

【0005】酵素としての機能解析は不十分であるにもかかわらず、本酵素はグルタミン酸およびアスパラギン酸のC末端側のペプチド結合を特異的に切断することから、蛋白質のアミノ酸配列の決定に汎用されている。また本酵素は尿素存在下 (2M程度) でも基質に作用することから遺伝子組換え技術で不溶性の融合蛋白として菌体内に大量に発現させた融合蛋白を尿素で可溶化した後、本酵素を作用させて目的ペプチドを融合蛋白から遊離させる工程にも使用されている。

【0006】本発明者等はヒトカルシトニンの遺伝子組換え法による製造に上に述べた方法を用い効率良くヒトカルシトニンの製造に成功している (特開平5-328992)。またヒトグルカゴンを大腸菌発現系で融合蛋白として発現させた例においても、*S. aureus* V8プロテアーゼが融合蛋白からヒトグルカゴンの切り出しに使用されている (Kazumasa Yosikawa et al. (1992) Journal of Protein Chemistry, 11, 517-525)。

【0007】このように本酵素は非常に多くの研究また遺伝子組換えによるペプチドの製造に用いられているにもかかわらず、*S. aureus* V8株の培養液から精製されているため、(1)微量に他のプロテアーゼが混在していること、(2)病原菌と考えられる菌から精製を行なわ

6

なければならないこと、(3)高価であること、が問題点としてあった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は目的のポリペプチド、例えば*S. aureus* V8プロテアーゼの大量生産を目的とする。高純度の目的ポリペプチド、例えば*S. aureus* V8プロテアーゼを製造することは研究上および産業上非常に有用であり、当該ポリペプチドの大量の工業的製造が非常に望まれている。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の目的を達成するためには、目的ポリペプチドをコードする遺伝子、例えば*S. aureus* V8株より*S. aureus* V8プロテアーゼの遺伝子を単離し、遺伝子組換え技術を用いて安全な宿主細胞、例えば大腸菌を使用することにより、大量に、しかも安価に当該ポリペプチド、例えば酵素を生産・精製することが必要である。

【0010】一般に、遺伝子工学的的方法により目的とするポリペプチド又は蛋白を製造するには、宿主により生産されたポリペプチドが宿主の生存や増殖、さらには目的ポリペプチド又は蛋白質の発現に悪影響を与えないようにするため、さらには発現された目的ポリペプチド又は蛋白質の単離・精製を容易にするために、目的ポリペプチド又は蛋白質を融合蛋白質として生成せしめ、それを不溶性の封入体として宿主細胞中に蓄積させることが好ましい場合がある。

【0011】しかしながら、目的とするポリペプチド又は蛋白質を含む融合蛋白質が必ずしも常に封入体を形成するとは限らない。このため、本発明の1つの態様においては、目的ポリペプチド又は蛋白質を他の蛋白質との融合蛋白質として発現せしめ、封入体として宿主細胞中に蓄積せしめる。宿主細胞が生来的に有するプロテアーゼは封入体に対して作用することができないが、封入体を単離し、溶解した後は、封入体に随伴している宿主由来のプロテアーゼが融合蛋白質に作用しこれを開裂せしめ、目的ポリペプチド又は蛋白質を遊離せしめることができる。こうして、本発明によれば、目的ポリペプチド又は蛋白質を効率的に製造することができる。

【0012】しかしながら、目的ポリペプチド又は蛋白質を常法に従って融合蛋白質にした場合、該融合蛋白質が封入体を形成するとは限らない。このような場合、本発明においては、目的ポリペプチド又は蛋白質のN末端側とC末端側に保護ペプチドを連結することによって融合蛋白質を形成することにより封入体を形成せしめる。そこで、本発明においては、遺伝子工学的的手法を用い大腸菌発現系で*S. aureus* V8プロテアーゼを大量にしかも純度良く効率的に製造する方法を具体例として記載する。

【0013】まず、本発明者らは*S. aureus* V8プロテアーゼを大量に大腸菌発現系を用いて生産させるには酵素活性を持たない融合蛋白法による発現方法が適切である

と考えた。なぜなら本酵素は蛋白質分解酵素であるため菌体内に直接本酵素を発現させると大腸菌蛋白を分解してしまい菌の増殖が停止し大量に *S. aureus* V8プロテアーゼを得ることが出来ないと考えられるからである。従って、酵素活性のない融合蛋白として発現させ、その後融合蛋白から他のプロテアーゼを用いて *S. aureus* V8プロテアーゼ部分を切り出し、活性の発現に必要な場合はリフォールディングを行ない、活性型の *S. aureus* V8プロテアーゼを精製することを考えた。

【0014】さらにこの融合蛋白からの切り出しに用いる他のプロテアーゼとして、本発明者らは大腸菌の外膜に存在すると考えられる *ompT*プロテアーゼの利用を考えた。安価に *S. aureus* V8プロテアーゼを製造するのに新たに他の酵素を添加することはコストの面で非常に不利と考えられるからである。*ompT*プロテアーゼを利用した大腸菌による生産は、(1) 製造プロセスが簡単である、(2) 他のプロテアーゼを新たに反応系に添加する必要がなく、コストが安くなる、(3) 大腸菌発現系で生産した各種の融合蛋白を大腸菌を宿主として生産したV8プロテアーゼで切断する際にはV8プロテアーゼに混入する恐れのあるV8プロテアーゼ生産宿主由来蛋白(市販V8プロテアーゼでは *S. aureus* 由来蛋白)の混入を考えなくてよい、等の面からも非常に有利であることは言うまでもない。

【0015】大腸菌 *ompT*プロテアーゼは大腸菌外膜画分に存在し塩基性アミノ酸対の間を選択的に切断するプロテアーゼである (Keijiro Sugimura and Tatsuro Nishihara (1988) J. Bacteriol. 170, 5625-5632)。Sugimura等は *ompT*プロテアーゼを精製し、50 mM リン酸緩衝液 (pH6.0) を用い 25℃ 30分間の反応条件で様々なペプチドを *ompT*プロテアーゼで切断し、アルギニン-アルギニン、リジン-リジン、アルギニン-リジンおよびリジン-アルギニンの塩基性アミノ酸対の間を切断する酵素であることを報告している。

【0016】しかし、尿素存在下 (2M以上の尿素濃度) で *ompT*プロテアーゼが活性を持つかどうかについては言及していない。*ompT*プロテアーゼは外膜に存在することから大腸菌体内で封入体として *S. aureus* V8プロテアーゼを生産させた後、菌体破砕後封入体を含む不溶性画分を遠心操作で分離すると沈殿画分にこの *ompT*プロテアーゼも共沈することが考えられる。

【0017】このようにして得られた沈殿画分に尿素を加え *S. aureus* V8プロテアーゼの融合蛋白を可溶化させる。この条件下で *ompT*プロテアーゼの活性が保持できているならば、融合蛋白から *S. aureus* V8プロテアーゼの切り出しに *ompT*プロテアーゼが利用できるのではないかと、さらに切り出された *S. aureus* V8プロテアーゼを活性型に変換するためにリフォールディングを行なえば *S. aureus* V8プロテアーゼが大量に簡単なプロセスで生産できるのではないかとということが考えられた。

【0018】以下、本発明を説明する。*S. aureus* V8プロテアーゼ遺伝子の遺伝子配列から成熟蛋白のN末端側には分泌に必要なシグナル配列 (プレ配列) および機能不明なプロ配列が存在し、C末端には前述のリピート配列が存在することが報告されている。そこで成熟蛋白のN末端からC末端までの遺伝子Iの調製、および成熟蛋白のC末端側にある機能不明なリピート配列を欠失した遺伝子IIの調製を行なった。この機能不明な繰り返し配列が酵素活性に必要なかどうかはわからないが、もし必要でないならば融合蛋白の分子量を下げることは細胞あたりの発現蛋白の分子数を上げることができ、発現蛋白を増加させることが可能になると考えた。

【0019】そこで、*Staphylococcus aureus* V8株 (ATCC27133) から染色体DNAを分離し、PCRを行ない2種類のV8プロテアーゼ誘導体遺伝子I、IIを調製した。これらの誘導体の発現を行なうために大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体を融合蛋白の保護ペプチドとした発現プラスミドpV8RPT(+) およびpV8RPT(-) を作製した。これらの発現プラスミドでは、大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体蛋白遺伝子とV8プロテアーゼ誘導体遺伝子 (I またはII) の間のリンカーペプチド遺伝子として *ompT*プロテアーゼの認識切断アミノ酸配列であるアルギニン-アルギニン残基を含むリンカー遺伝子 (例えばR6リンカー遺伝子) を挿入した融合蛋白をラクトースプロモーターの支配下に発現する。

【0020】このようにデザインされた融合蛋白では、不溶性の融合蛋白としてV8プロテアーゼ誘導体を発現させた後、尿素を用いて融合蛋白を可溶化し、尿素濃度を下げれば *ompT*プロテアーゼが融合蛋白を切断し、大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体蛋白とV8プロテアーゼ誘導体蛋白を分離できると考えられたからである。以上のようにデザインされた発現プラスミドを作製し、大腸菌JM101を宿主としてIPTG (イソプロピルーβ-D-チオ-ガラクトピラノシド; 以下IPTG) を用いて発現誘導させたところ、2種類の融合蛋白質はともに不溶性にならずに菌体破砕後その上清画分に酵素活性が認められた。

【0021】一方、発現誘導後菌体の増殖は著しく低下していた。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析では菌体内蛋白が、発現したV8プロテアーゼ誘導体の酵素活性により分解されていることが明らかになった。従って、この大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体とV8プロテアーゼ誘導体との融合蛋白発現法は、

(1) 発現蛋白が酵素活性を持ち宿主の増殖阻害を引き起こすこと、さらに (2) 融合蛋白の発現量も非常に低いことからV8プロテアーゼ誘導体の生産方法としては適していないことが明らかになった。

【0022】但し、これらの結果から、(1) N末端側のプロ配列はV8プロテアーゼのフォールディングに関与していない可能性があること、及び、(2) C末端のリピート配列を持たないタイプのV8プロテアーゼ誘導

体IIにおいても活性があることから、このリピート配列はV8プロテアーゼ酵素活性には必要ない可能性が考えられた。次に、本発明者等はV8プロテアーゼを大腸菌発現系で不溶性の融合蛋白として発現させ、その後尿素による可溶化をおこない蛋白分解酵素を用い尿素存在下に融合蛋白からV8プロテアーゼ部分を遊離し、リフォールディングを行ない、酵素活性を有するV8プロテアーゼを生産するにあたり、以下に述べる作業仮説を設定し実験に着手した。

【0023】(1) 上述の大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体をV8プロテアーゼのN末端側に融合させた場合、不溶性の融合蛋白質にはならない。従って、そのような場合は不溶性の融合蛋白質を形成させるために更に保護ペプチドを付加することを考え、当該保護ペプチドとしてトランスポゾン903であるカナマイシン耐性遺伝子(Nucleic Acids Res. (1988) 16, 358-358)由来のアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白を用いることにした。即ち、大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体及びV8プロテアーゼからなる融合蛋白質のC末端にリンカーペプチドを介しさらにアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白の一部を付加することにより融合蛋白の不溶化を促進させ、封入体形成を行なうことを考えた。

【0024】また、(2) 生産された融合蛋白質からV8プロテアーゼ部分を酵素的に遊離させるのに前述のR6リンカーをV8プロテアーゼのNおよびC末端側に配置し、塩基性アミノ酸対の間を切断するompIで切断させることにより融合蛋白からV8プロテアーゼを解離させることができるのではないかと考えた。

【0025】そこで、以上のような作業仮説を基にして新規発現プラスミドの構築に着手し、大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体-V8プロテアーゼ誘導体にアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼの一部を融合させた融合蛋白を発現するプラスミドpV8Dを作製した。なお、このプラスミドにコードされたV8プロテアーゼ誘導体(以下、V8D蛋白と記載)は前述のV8プロテアーゼ誘導体IIよりC末端より8アミノ酸が欠失したものであり、このV8DのN末端側とC末端側はR6リンカーペプチドを介して大腸菌β-ガラクトシダーゼ誘導体及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼの一部と融合されている。

【0026】pV8Dを有する大腸菌JM101を培養し、IPTGによる発現誘導を行なったところ発現した60キログルトンの融合蛋白は不溶性の封入体を菌体内に形成していたことがSDS PAGEによる解析から明らかになった。従って、V8D蛋白のC末端側にアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白の一部を融合することで不溶性の封入体形成が起こることが明らかになった。次に、菌体破砕後、遠心操作を行ない封入体を分離し、変性剤を用いて融合蛋白を可溶化する。変性剤としては尿

素、塩酸グアニジンまたは界面活性剤等を用いることができる。

【0027】本願の実施例では、8Mの尿素を用いて封入体を可溶化し、4M尿素濃度に希釈し、37℃で2時間インキュベートを行なった。大腸菌の内在性ompIプロテアーゼはこの条件下において融合蛋白を切断し、β-ガラクトシダーゼ誘導体、V8D蛋白、およびアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白の一部にそれぞれ相当する12KDa、26KDa および22KDaのバンドを生成していることがSDS PAGE解析により明らかになった。

【0028】一方、ompI欠損変異株であるW3110M25を宿主菌として同様な実験を行なった結果では上記のバンドは検出できず、融合蛋白を特異的に切断しているのは大腸菌内因性のompIであることを明らかになった。さらにompIにより特異的に切断されていることを確認するため、SDS PAGEからV8D蛋白に相当する26KDaのバンドをSDS PAGEのゲルから切り出し、N末端アミノ酸配列を決定したところR6リンカーペプチドのアルギニン-アルギニン配列の間で切断が起きていることが確認された。

【0029】従って、融合蛋白及び大腸菌内在性のompIプロテアーゼは、遠心操作により生成する沈殿物の封入体画分に存在し、変性剤による可溶化、特に8M尿素による封入体の可溶化後、4M尿素存在下でも十分に酵素活性を有し、しかも正確に期待されるアミノ酸配列を切断することができるということが本発明により初めて明らかになった。尿素存在下で生成されたV8プロテアーゼ誘導体蛋白は変性状態にあるために酵素活性は非常に低いと考えられる。そこで、活性の発現のために必要であれば変性剤の濃度を下げることにによりV8D蛋白のリフォールディングを行ない、酵素活性のあるV8D蛋白が得られるかどうかを検討した。

【0030】ompI切断反応後の試料を0.4Mリン酸カリウムバッファー(pH7.5)で20倍に希釈後、氷中に一夜放置した。この操作によりV8D蛋白は約20%リフォールディングされ酵素活性の回復が見られた。この操作後のサンプルをSDS-PAGEによる解析を行なうとリフォールディング後にはV8D蛋白が主として存在する蛋白であった。これはリフォールディング前のサンプルにはβ-ガラクトシダーゼ誘導体、アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白の一部および大腸菌由来蛋白が存在するが、リフォールディング後、プロテアーゼ活性を持ったV8D蛋白が他の混在する蛋白を分解したことによると考えられる。この結果はリフォールディング後にV8D蛋白を精製する際に非常に有利である。

【0031】次に、上述の操作により活性型となったV8D蛋白が天然型の*S. aureus* V8プロテアーゼと同一な基質認識があるかどうかを検討した。基質(例えば、

ヒトカルシトニン前駆体の融合蛋白)にリフォールディングを行なったV8D蛋白および天然型酵素を30℃、1時間反応させ、酵素により切断された融合蛋白から生じるペプチド断片を高速液体クロマトグラフィーで解析した。その結果、両酵素から生じるペプチド断片は同一の溶出パターンを示し、上述の方法で作製したV8D蛋白は天然型と同じ基質特異性を持つ事が明らかになった。

【0032】*S. aureus* V8プロテアーゼを不溶性の封入体として菌体内に発現させるには、融合蛋白に蛋白分解酵素としての酵素活性がないことが必要であるが、一方、リフォールディングを行なった後は酵素活性を有していなければならない。この一見矛盾する性質がV8プロテアーゼ誘導体蛋白に要求される。V8D蛋白においては天然型V8プロテアーゼのN末端から212番目のアミノ酸までを用い融合蛋白を作製したが、さらにC末端側にV8プロテアーゼ部分を延ばしアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ蛋白の一部との融合蛋白を作製した場合、封入体形成とリフォールディングによる再活性化が起こるかどうかを検討した。

【0033】本発明者らは、上述のV8プロテアーゼ誘導体のC末端側が2, 4, 6および8アミノ酸延長した融合蛋白を発現するプラスミド(pV8H, pV8F, pV8A, pV8D2, およびpV8Q)をPCR法と遺伝子クローニングにより作製した。大腸菌株JM101にこれらのプラスミドを形質転換し、組換え体を作製した。得られた菌株を培養しIPTGを用いて発現誘導させたところ、前述のpV8D, pV8HおよびpV8Fのプラスミドを有する菌株のみが融合蛋白の封入体を形成し、さらにompTによる融合蛋白の切断後のリフォールディングにおいても酵素の再活性化が出来た。他の菌株は封入体形成は起こらず、菌体破碎後の可溶性画分にV8プロテアーゼ活性が認められた。

【0034】従って、V8プロテアーゼ誘導体蛋白を融合蛋白発現方法で発現させ、封入体を形成させた後、酵素的に切断し、リフォールディングを行なうには、*S. aureus* V8プロテアーゼ蛋白のN末端から215番目のアミノ酸であるフェニルアラニン以前で融合させることが必要であることが明らかになった。以上、本発明を、目的ポリペプチド又は蛋白質としてV8プロテアーゼを例にとって具体的に説明したが、これと同様の原理及び手法を他の目的ポリペプチド又は蛋白質に応用することにより、所望の目的ポリペプチド又は蛋白質を効率よく製造することができる。

【0035】従って、本発明は、保護ポリペプチド及び目的ポリペプチドからなる融合蛋白をコードする遺伝子を有する発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、当該遺伝子を発現させ、当該宿主細胞の内在性プロテアーゼにより当該融合蛋白より目的ポリペプチドを切断して得ることを特徴とする目的ポリペプチドの製造方法に関するものである。

【0036】更に、本発明は、融合蛋白を式(1) A-L-B、又は式(2) A-L-B-L-C(式中、A及びCは保護ポリペプチド、Bは目的ポリペプチド、Lは宿主細胞内在性プロテアーゼが特異的に認識する基質を有するリンカーペプチドを示す)のように表すことができるので、当該融合蛋白をリンカーペプチドLの領域で切断して当該融合蛋白から目的ポリペプチドBを得ることを特徴とする製造方法に関する。ここで目的ポリペプチドとは、前述の*S. aureus* V8プロテアーゼに加えて、例えば生理活性ペプチド、例えばモチリン、グルカゴン、副腎皮質ホルモン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、セクレチン、成長ホルモン、インシュリン、成長ホルモン分泌ホルモン、パゾプレッシン、オキシトシン、ガストリン、グルカゴン様ペプチド(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド(GLP-2)、グルカゴン様ペプチド(7-36アミド)、コレシストキニン、パソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド(vasoactive intestinal polypeptide; VIP)、

【0037】下垂体アデノレートサイクラーゼ活性化ポリペプチド(Pituitary adenolatecyclase activating polypeptide)、ガストリン放出ホルモン、ガラニン、甲状腺刺激ホルモン、黄体形成ホルモン放出ホルモン、カルシトニン、副甲状腺ホルモン(PTH, PTH(1-34) PTH(1-84))、ペプチド・ヒスチジン・イソロイシン(peptide histidine isoleucine; PHI)、ニューロペプチドY(neuropeptide Y)、ペプチドYY(peptide YY)、パンクレアチック・ポリペプチド(pancreatic polypeptide)、ソマトスタチン、TGF- α 、TGF- β 、神経成長因子、繊維芽細胞成長因子、リラキシン、プロラクチン、心房性ナトリウム利尿ペプチド(atrial natriuretic peptide; ANP)、B-型利尿ペプチド(B-type natriuretic peptide; BNP)、C-型利尿ペプチド(C-type natriuretic peptide; CNP)、アンジオテンシン、脳由来神経栄養因子(BDNF)更に、例えば酵素、例えばKEX2エンドプロテアーゼなどが挙げられる。

【0038】また、本発明における好ましい態様としては、目的ポリペプチドが生理活性ポリペプチドである場合、好ましくは当該生理活性ポリペプチドが酵素である場合が挙げられる。そして、具体例として最も好ましい態様としては、目的ポリペプチドが蛋白質分解酵素であって、目的ポリペプチドを不活性型の融合蛋白として宿主細胞内に発現させ、当該細胞を破碎し、当該融合蛋白を分離した後、当該融合蛋白を可溶化する変性剤により融合蛋白を可溶化し、その後、リンカーペプチド領域を宿主細胞内在性プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得る目的ポリペプチドの製造方法が挙げられる。

【0039】更にその他の好ましい態様としては、目的

ポリペプチドが蛋白質分解酵素である際に、目的ポリペプチドを不活性型の融合蛋白として宿主細胞内に発現させ、当該細胞を破碎し融合蛋白を分離した後、当該融合蛋白を可溶化する変性剤により融合蛋白を可溶化し、その後、宿主細胞由来の内在性プロテアーゼ活性が発現しうる程度にまで当該変性剤の濃度を下げて、リンカーペプチドを当該内在性プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得る目的ポリペプチドの製造方法が挙げられる。上記の場合、何れも宿主細胞由来の内在性プロテアーゼが融合蛋白と菌体破碎後の分離操作において同じ画分に存在することが好ましい。

【0040】保護ポリペプチドは、目的ポリペプチドの発現時に当該保護ポリペプチドとの融合蛋白として発現しうるものであれば特に特定されるものではないが、例えば大腸菌 β -ガラクトシダーゼ由来ポリペプチドやトランスポゾン 903 由来のアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ由来ポリペプチド等を挙げることができ、必要であればそれらポリペプチドを組み合わせることで保護ポリペプチドとして用いることもできる。

【0041】リンカーペプチドは、目的ポリペプチドの発現ベクターを有する宿主細胞の内在性プロテアーゼにより特異的に認識される部位を有するリンカーペプチドであればよい。当該リンカーペプチドの好ましい態様としては、例えば 1 塩基性アミノ酸残基又は連続した 2 塩基性アミノ酸残基を有する塩基性アミノ酸対配列を当該リンカーペプチド中に含み、且つ当該リンカーペプチドが 2~50 のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが望ましく、当該塩基性アミノ酸対を当該リンカーペプチドの N 末端部及び／又は C 末端部に含む場合であってもよい。

【0042】融合蛋白を可溶化する場合の変性剤も特に特定される必要はなく、例えば、尿素、塩酸グアニジン又は界面活性剤等が挙げられる。好ましくは尿素を用いることが挙げられ、この場合の尿素濃度は 1-8 M であることが望ましい。また、融合蛋白を可溶化した後の尿素濃度は、宿主細胞由来の内在性プロテアーゼ活性が発現しうる程度であれば特に特定されるものではない。

【0043】また、本発明は宿主細胞由来の内在性プロテアーゼを用いて融合蛋白より目的ポリペプチドを切断して得ることを特徴とする目的ポリペプチドの製造方法であり、宿主細胞由来の内在性プロテアーゼ及び目的ポリペプチドは特に特定される必要はない。即ち、当該プロテアーゼは、種々の目的ポリペプチドまたは蛋白を不溶性の融合蛋白として発現させた後、当該融合蛋白からの目的ポリペプチドまたは蛋白のプロセッシングに用いることができればよく、例えば蛋白質分解酵素等を挙げることができ、好ましくは、以下の実施例で示すように大腸菌 ompT プロテアーゼ等を挙げることができる。また、目的ポリペプチドは 20~800 のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが好ましく、例えば以

下の実施例で示すように *S. aureus* V8 プロテアーゼ及び／又は当該誘導体等を挙げることができる。

【0044】以上の結果、本発明に係る遺伝子組換え技術を用いた目的ポリペプチドの製造方法においては、特に V8 プロテアーゼ誘導体蛋白を大腸菌発現系で生産できることが明らかになった。即ち、当該目的ポリペプチドの製造方法における好ましい態様としては、以下の製造工程を挙げることができる。即ち、

【0045】(1) 融合蛋白が保護ポリペプチド、目的ポリペプチド及びリンカーペプチドからなり、当該保護ポリペプチドが大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ由来ポリペプチド及び／又はトランスポゾン 903 由来のアミノグリコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼ由来ポリペプチドであり、当該目的ポリペプチドが *S. aureus* V8 プロテアーゼ誘導体であり、当該保護ポリペプチドと当該目的ポリペプチドの間の当該リンカーペプチド領域が宿主細胞内在性プロテアーゼにより特異的に認識される基質を有するリンカーペプチド領域である、当該融合蛋白をコードする遺伝子を有する発現ベクターにより宿主細胞である大腸菌を形質転換し、

【0046】(2) *S. aureus* V8 プロテアーゼ誘導体が不活性型の状態で当該融合蛋白を大腸菌内で発現させ、

(3) 当該菌体を破碎し、当該融合蛋白を分離した後、菌体内在性プロテアーゼである大腸菌 ompT プロテアーゼと当該融合蛋白が存在する画分を得、

(4) 当該融合蛋白を変性剤により可溶化し、

【0047】(5) 可溶化後、大腸菌 ompT プロテアーゼの活性が発現する状態まで変性剤の濃度を下げて、上記リンカーペプチド領域を当該プロテアーゼで切断することにより目的ポリペプチドを融合蛋白より得る工程、からなることを特徴とする目的ポリペプチドの製造法を挙げることができ、更に必要であれば、当該目的ポリペプチドが活性型となるようにリフォールディングを生じさせる工程、が加わることを特徴とする製造法を挙げることができる。

【0048】V8 プロテアーゼ誘導体のリフォールディング後、この蛋白質を精製する方法としては、例えばゲル濾過、イオンクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー等の通常の蛋白の精製操作により、高純度に精製できる。さらに、実施例で示した V8 プロテアーゼ誘導体に関しては、リフォールディング反応終了時には当該誘導体が反応成分の主要蛋白成分であることから、精製法が非常に容易であることは述べるまでもない。

【0049】

【実施例】以下、実施例において本発明を詳述する。

実施例 1. *S. aureus* V8 プロテアーゼ遺伝子の単離 PCR 法により V8 プロテアーゼ遺伝子を単離するため、報告されている DNA 塩基配列に基づき、PCR 法により遺伝子の単離を行った。図 1 の (b) に示す配列を持つ 3 種の PCR プライマーを設計し DNA 合成機 (アプライド・バ

イオシステム社製 392型) により合成した。プライマー I、II および III は図 1 (a) に示す V8 プロテアーゼ遺伝子領域に対応し、5' 側には Xho I あるいは Sal I 制限酵素部位を設けている。

【0050】Jayaswal, R. K. ら (J. Bacteriol. 172: 5783-5788 (1990)) の方法により単離調製した *Staphylococcus aureus* V8 株 (ATCC27733) の染色体とこれらの PCR プライマーを用いて PCR を行った。1.0 μ M のプライマー、1 μ g の染色体 DNA、50mM KCl、10mM Tris-HCl, pH8.3、1.5mM MgCl₂、0.01% ゼラチン、200 μ M の dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP の混合物) を含む 50 μ l の反応液に 2.5 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼを添加し、94℃、1分、72℃、2分、55℃、2分の PCR を 30 サイクル行った。

【0051】その結果、プライマー I とプライマー II によりブレプロ配列を含まずリピーター配列を含む成熟体の V8 プロテアーゼ遺伝子 (プロテアーゼ遺伝子誘導体 I, 0.8kb) が得られ、プライマー I とプライマー III により、ブレプロ配列およびリピーター配列を欠く V8 プロテアーゼ遺伝子 (V8 プロテアーゼ遺伝子誘導体 II, 0.7kb) が得られた。次に、これらの遺伝子を寒天ゲル電気泳動し、SUPREP-2 (宝酒造 (株)) を用いて精製した後、制限酵素 XhoI および SalI で切断し、XhoI, SalI の粘着末端をもつ V8 プロテアーゼ誘導体遺伝子断片 I および II を調製した。

【0052】実施例 2. 発現ベクター pV8RPT (+) および pV8RPT (-) の作製並びに V8 プロテアーゼ誘導体の発現
本実施例で用いる pG97S4DhCT [G] R6 は、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ誘導体とヒトカルシトニン前駆体 (hCT [G]) との融合蛋白質を高発現するプラスミドであり、当該プラスミドはプラスミド pBR322 とプラスミド pG97S4DhCT [G] より作成することができる (特開平 5-328992、及び図 2 参照)。プラスミド pG97S4DhCT [G] を含有する大腸菌 W3110 株はブダペスト条約に基づいて工業技術院生命工学技術研究所に *Escherichia coli* SBM323 として 1991 年 8 月 8 日に寄託されており、受託番号 微工研条寄第 3503 号 (FERM BP-3503) が付与されている。

【0053】PCR により得られた V8 プロテアーゼ遺伝子誘導体 I および II を発現させるため、pG97S4DhCT [G] R6 を XhoI および SalI で処理し、ヒトカルシトニン前駆体遺伝子部を欠いた DNA 断片 (3.1kb) を寒天ゲル電気泳動により調製した。この DNA 断片と先に得られた XhoI, SalI の粘着末端をもつ V8 プロテアーゼ遺伝子断片を T4 DNA リガーゼにより連結し、JM101 に形質転換を行い、V8 プロテアーゼ遺伝子誘導体 I がクローニングされた pV8RPT (+)、および V8 プロテアーゼ遺伝子誘導体 II がクローニングされた pV8RPT (-) を作製した (図 3)。

【0054】なおプラスミドの宿主菌には JM101 株 (本菌株は、例えば宝酒造 (株)、In Vitrogen Catalog N

o. c660-00 等より入手できる) を用いた。これらのプラスミドより発現される V8 プロテアーゼ誘導体と β -ガラクトシダーゼ誘導体との融合蛋白質のアミノ酸配列を図 4 に示す。JM101/pV8RPT (+) および JM101/pV8RPT (-) をそれぞれ 100ml の LB 培地 (0.5% 酵母エキス、1.0% トリプトン、0.5% NaCl) を用い 37℃ で OD660 が 1.0 になるまで培養後、イソプロピルチオオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度が 2mM になるように添加し発現の誘導を行った。添加後さらに 2 時間培養を継続した後、菌体を遠心分離により回収し、OD660 が 5 となるように TE バッファー (10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA) に懸濁した。

【0055】本懸濁液を超音波破砕機 (Cellruptor; 東湘電気 (株)) で破砕後、12000rpm、5 分の遠心分離により不溶性画分を除去し、上清画分を粗酵素液として使用した。V8 プロテアーゼの活性測定には合成基質 (Z-Phe-Leu-Glu-4-nitranilide; ベーリンガーマンハイム社製) を用いた。940 μ l の 100mM Tris-HCl (pH8.0) 緩衝液に 20 μ l の 10mM Z-Phe-Leu-Glu-4-nitranilide 溶液 (DMSO 溶液) を混合後、40 μ l の粗酵素液を添加し、室温 5 分間の反応による 405nm の吸収増加を測定した。測定には日立分光光度計 U-3200 を使用した。

【0056】その結果、JM101/pV8RPT (+) および JM101/pV8RPT (-) 共に、それらの菌体より調製した粗酵素液には 8 μ g/ml の酵素活性が認められ、 β -ガラクトシダーゼ誘導体との融合蛋白質の形で、かつブレプロ配列を欠いた状態で活性があることが判明した。また C 末端リピーター配列を欠失している pV8RPT (-) においても活性が認められたことからこの配列は活性に必須ではないことも判明した。

【0057】JM101/pV8RPT (-) および JM101/pV8RPT (+) が生産する V8 プロテアーゼ誘導体 I および II の生産量は低く、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) でそのバンドが確認できないことから、精製操作が困難である。菌体増殖は IPTG の添加とともに停止すること、かつ誘導をかけた菌は誘導していない菌に比べ高分子量の蛋白質が減少していることを考慮すると、細胞内で発現した V8 プロテアーゼ誘導体が菌にとって致死的原因であることが発現量の低い原因と考えられる。

【0058】実施例 3. 発現ベクター pV8D の作製
V8 プロテアーゼの場合、前述のように N 末端側に β -ガラクトシダーゼ誘導体を融合させた場合においても活性を有していることから、N 末端側のみの融合では不活性体出来ない。そのため C 末端側にさらにアミノグルコシド 3'-ホスホトランスフェラーゼの一部を融合させ V8 プロテアーゼを不活化することを試みた。C 末端側の融合にはリピーター配列の手前の EcoRV 部位を用いた。

【0059】V8 プロテアーゼ誘導体に係るプラスミド pV8D は図 5 に示す手順で作製した。pV8RPT (-) より Bgl II-Sal I 断片 (3.0kb) および EcoRV-Bgl II 断片 (0.7k

b) を調製し、pG97S4DhCT [G] R10より調製したNar I-Sa I I 断片 (0.2kb) と連結させることによりpV8hCT [G] を得た。なお、pG97S4DhCT [G] R10は上記のpG97S4DhCT [G] R6 と同様にプラスミドpBR322とプラスミドpG97S4DhCT [G] より作成することができる (特開平5-328992、及び図2参照)。

【0060】次に、得られたpV8hCT [G] のhCT [G] 部分 (0.1kb BstE II-Sa I I 断片) をpUC4K (Vieira, J. and Messing, J., Gene 19, 259 (1982), Pharmacia Co. No. 27-4958-01) のアミノグルコシド3' -ホスホトランスフェラーゼ遺伝子領域を含む0.8kb SmaI-Sa I I断片と入れ換えpV8Dを作製した。本プラスミドより発現されるV8プロテアーゼ誘導体の融合蛋白質 (V8D融合蛋白質) のアミノ酸配列を図6に示す。

【0061】本融合蛋白質は、V8プロテアーゼのN末端およびC末端にR6リンカー配列を介してβ-ガラクトシダーゼ誘導体およびアミノグルコシド3' -ホスホトランスフェラーゼの一部がそれぞれ融合された構造をもつ。R6リンカーは以下の配列、即ち、RLYRRHWRGSGSPLRAHE (配列番号: 1) を有し、当該配列中のRRの中央のペプチド結合が大腸菌のOmpTプロテアーゼにより切断される構造を有している。

【0062】実施例4. V8D 融合蛋白質の発現
 常法によりpV8Dで形質転換された大腸菌JM101 (JM101/pV8D) を100ml のLB培地に於て37℃でOD660 が0.6まで培養後、IPTGを最終濃度が2mM になるように添加しV8D 融合蛋白質の生産を誘導した。添加後さらに2時間培養を続け、その後、遠心分離により菌体を回収した。本菌株の場合、JM101/pV8RPT (+) およびJM101/pV8RPT (-) のように融合蛋白質の発現の誘導と共に菌体増殖が停止する現象はなく、菌体内にはV8プロテアーゼ活性は認められなかった。

【0063】また顕微鏡により菌体内には封入体を形成していることが観察された。誘導前後の菌体および菌体を超音波破碎して得られた不溶性画分と可溶性画分の16% SDS-PAGEの結果を図7に示す。誘導後の菌体には60kDa のV8D 融合蛋白質が高発現しており、さらにそれは封入体を形成しているため不溶性画分に存在していることがわかる。

【0064】V8プロテアーゼ誘導体のC末端側にアミノグルコシド3' -ホスホトランスフェラーゼの一部を融合させたことにより菌体内において本来の立体構造をとれず不活性となり、菌体増殖を阻害しなくなったため、封入体を形成するレベルまで高発現したと考えられた。なお60kDa のV8D 融合蛋白質以外に27kDa の蛋白質も不溶性画分に認められ、この蛋白質をSDS PAGEのゲルより分離しアミノ酸配列を調べたところV8D 融合蛋白質のN末端から282番目のメチオニン以降を含む分解物であることが判明した。

【0065】実施例5. V8D 融合蛋白質のOmpTプロテ

アーゼによるプロセッシング

実施例4に示した培養により得られた菌体を10mlのTEバッファーに懸濁後、超音波処理し菌体を破碎した。その後、遠心分離により封入体を回収した。得られた封入体を再度10mlの脱イオン水に懸濁後、遠心分離することにより封入体の洗浄を行った。OD660 の値が100 となるように封入体を脱イオン水で希釈後、150μl を採取し1M Tris-HCl (pH8.0) を25μl, 1M ジチオスレイトール (DTT) を2.5 μl、および尿素を120mg 加え封入体を溶解した後、500 μl になるように脱イオン水を加え、37℃で2時間加温した。

【0066】図8A は加温前後の16% SDS-PAGEの結果である。加温後の試料には12kDa、26kDa、22kDa の分子量をもつ、それぞれβ-ガラクトシダーゼ誘導体、V8プロテアーゼ誘導体、アミノグルコシド3' -ホスホトランスフェラーゼの一部に相当するバンドが出現していることがわかる。一方図8B はOmpT プロテアーゼの欠損株W3110 M25 (Sugimura, K. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 753-759) を宿主とし、V8D 融合蛋白質を発現させ、得られた封入体に対し同様の操作を行ったものである。この場合上記の3つのバンドはSDS-PAGE中に検出できないことより、本融合蛋白質のプロセッシングはOmpT プロテアーゼ (Sugimura, K. and Nishihara, T. (1988) J. Bacteriol., 170, 5625-5632) による特異的な切断と判断される。

【0067】さらにSDS-PAGEより26kDa のバンドを切り出しN 末端アミノ酸配列を調べたところ、R6配列 (RLYRRHWRGSGSPLRAHE) (配列番号: 1) のRR部分の中央で切断されていることが確認され、融合蛋白質の切断はOmpTプロテアーゼにより特異的に行われていることが確認された。上記の操作は封入体溶解時には8M尿素、プロセッシング時には4M尿素の存在化で行われており、以上の結果により、OmpTプロテアーゼがこのような高濃度の尿素に対して耐性を持ち、封入体より溶解された融合蛋白質を特異的に切断出来ることが初めて示された。

【0068】実施例6. 組換えV8プロテアーゼ (V8D) のリフォールディング

プロセッシング処理後の試料を0.4Mリン酸カリウムバッファー (pH7.5) で20倍希釈し、氷中に一晩放置した。この操作により組換えV8プロテアーゼ (V8D) がリフォールディングし、前述の方法に従い測定したところ30μg/mlに相当する活性が得られた。なおリフォールディングの効率は約20%であった。図9はリフォールディング操作前後の16% SDS-PAGEの結果である。

【0069】組換えV8プロテアーゼ (V8D) がリフォールディングした際、強力なプロテアーゼとして働くことによりβ-ガラクトシダーゼ誘導体、アミノグルコシド3' -ホスホトランスフェラーゼ由来の蛋白、およびその他の大腸菌由来の蛋白質は分解を受けるためそれらの蛋白質のバンドは消失する。従ってリフォールディング

操作を施した後の試料は組換えV8プロテアーゼ(V8D)のみが主要な蛋白質として残り、後の精製操作の大幅な軽減が期待できる。このようにして得られた組換えV8プロテアーゼ(V8D)は遺伝子の構築上、天然型のものに比べC末端が56アミノ酸欠失したものであるが活性は維持しており、この欠失領域は活性には必須ではないことが判明した。

【0070】実施例7. 封入体からのリフォールディングにより得られた組換えV8プロテアーゼ(V8D)の基質特異性

リフォールディングにより得られた組換えV8プロテアーゼ(V8D)の基質特異性を天然型のものと比較するため、基質としてヒトカルシトニン前駆体(hCT[G])の融合蛋白質を用い、当該蛋白質に両プロテアーゼを作用させhCT[G]を遊離させる実験を行った。

【0071】実験に用いたヒトカルシトニン融合蛋白質は、 β -ガラクトシダーゼ誘導体(108 アミノ酸)とhCT[G]がグルタミン酸を有するリンカーを介して融合された構造を持ち、天然型のV8プロテアーゼはこのグルタミン酸残基のカルボキシル側のペプチド結合を切断しhCT[G]を遊離させることができる。なお、当該融合蛋白質をコードする遺伝子を有するプラスミドとしては、pG97S4 DhCT[G]R4(特開平5-328992参照)を挙げる

【0072】10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA、5mM DTT、2M 尿素及び10mg/mlのヒトカルシトニン融合蛋白質を含む溶液1mlに、天然型のV8プロテアーゼに換算して1.2 μ gの活性に相当する量の組換えV8プロテアーゼ(V8D)を加え30°Cで1時間反応した後、反応液を、高速液体クロマトグラフィー(0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)と0.1%TFA/50%アセトニトリルを用いた直線濃度勾配による溶出)により分析した。

【0073】なお組換えV8プロテアーゼ(V8D)はリフォールディング後の試料を直接用い、また比較対照として市販の天然型V8プロテアーゼを同条件で作用させた試料を用いた。図10に高速液体クロマトグラフィーの溶出パターンを示す。組換えV8プロテアーゼ(V8D)と天然型V8プロテアーゼ間でヒトカルシトニン融合蛋白質に対する切断パターンは同一であり基質特異性において両プロテアーゼは同等であることが確認された。

【0074】実施例8. V8プロテアーゼのC末端側の融合部位についての検討

V8D融合蛋白質に比べ、V8プロテアーゼ部のC末端側が2、3、4、6および8アミノ酸だけ伸長した融合蛋白質を作製するため、図11に示すPCRプライマーを合成した。3アミノ酸伸長したタイプの融合蛋白質(V8F融合蛋白質)をコードするpV8Fは以下の方法により作製した。プライマーbと図1(b)に示したプライマーlを用い、鋳型DNAとして実施例1で作製したpV8RPT(-)を0.1 μ g用いてV8プロテアーゼ遺伝子側の増幅反応を行

った後、EcoRIおよびSacIで切断し0.1kbの遺伝子断片を調製した。

【0075】一方プライマーgとプライマーhおよび鋳型DNAとしてpV8Dを0.1 μ g用いてR6リンカー配列とアミノグルコシド3'ホストトランスフェラーゼ遺伝子部の増幅反応を行った後、EcoT22IおよびSacIで切断し0.3kbの遺伝子断片を調製した。なおPCRは実施例1の条件に従った。このようにして得られた0.1kbと0.3kbの遺伝子とpV8DのEcoRI-EcoT22I断片(4.2kb)を連結しpV8Fを作製した(図12、図14参照)。プライマーa、c、d、eおよびプライマーgについても、同操作(但しpV8Hの作製についてはSacIの代わりにNdeIを使用)を行うことによりpV8H、pV8A、pV8D2、pV8Qを作製した。これらのプラスミドの作製に使用したプライマーと鋳型DNAの組み合わせを以下に示す。

【0076】pV8H：プライマーa、プライマーl、pV8RPT(-)およびプライマーl、プライマーh、pV8Dの組み合わせより得られたPCR産物より作製。

pV8A：プライマーc、プライマーl、pV8RPT(-)およびプライマーg、プライマーh、pV8Dの組み合わせより得られたPCR産物より作製。

pV8D2：プライマーd、プライマーl、pV8RPT(-)およびプライマーg、プライマーh、pV8Dの組み合わせより得られたPCR産物より作製。

pV8Q：プライマーe、プライマーl、pV8RPT(-)およびプライマーg、プライマーh、pV8Dの組み合わせより得られたPCR産物より作製。

【0077】これらのプラスミドからは実施例4で示したV8D融合蛋白質に比べ、V8プロテアーゼ領域のC末端部分がそれぞれ2、4、6、および8アミノ酸分だけ伸長した融合蛋白質が生産される(図13、図14参照)。JM101株にこれらのプラスミドを形質転換し実施例4と同じ操作により各融合蛋白質の発現を調べた結果を図13に示す。封入体の形成はpV8H、pV8FおよびpV8Dに認められ、得られた封入体は実施例5に示した操作を施すことで活性ある組換えV8プロテアーゼにリフォールディングさせることが出来た。一方、pV8A、pV8D2、pV8Qの場合封入体は得られず、可溶性画分にV8プロテアーゼ活性が認められた。

【0078】これらのプラスミドの場合、発現した融合蛋白質はプロテアーゼ活性を持ち、増殖を阻害することが封入体を形成しない原因と考えられる。すなわちV8プロテアーゼを不活性な融合蛋白質として発現させるにはN末端から215番目のフェニルアラニン以前で融合させることが重要であり、この部位を超えて融合した場合にはV8プロテアーゼ部分が本来の立体構造を形成しプロテアーゼ活性をもった融合蛋白質が生産されるため増殖阻害を起こし高発現出来ないことが判明した。

【0079】

【発明の効果】本発明により目的のポリペプチドを大量

22

* 【配列表】

配列の長さ : 20

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser Pro Leu
5 10 15

20

※鎖の数：単鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

ACCGCTCGAG GTTATATTAC CAAATAACGA T

31

★鎖の数：単鎖

トポロジー：直鎖状

★20 配列の種類：合成DNA

CTTAATGTCG ACTTAAGCTG CATCTGGATT

30

☆鎖の数：単鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

TCGCGTCGAC TTATTGGTCA TCGTTGGCAA A

31

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

30

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
1 5 10 15

Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
20 25 30

Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
35 40 45

Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
50 55 60

Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Asp Ser Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro
65 70 75 80

Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
85 90 95

Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser
100 105 110

Gly Ser Pro Leu Arg Ala His Glu Gln Phe Leu Glu Val Ile Leu Pro
115 120 125

Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn Gly His Tyr Ala
130 135 140

Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly Thr Phe Ile Ala

23 24
 145 150 155 160
 Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr Asn Lys His Val
 165 170 175
 Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys Ala Phe Pro Ser
 180 185 190
 Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe Thr Ala Glu Asn
 195 200 205
 Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile Val Lys Phe Ser
 210 215 220
 Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val Lys Pro Ala Thr
 225 230 235 240
 Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn Ile Thr Val Thr
 245 250 255
 Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp Glu Ser Lys Gly
 260 265 270
 Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr Asp Leu Ser Thr
 275 280 285
 Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu Lys Asn Glu Val
 290 295 300
 Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe Asn Gly Ala Val
 305 310 315 320
 Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln Asn Ile Glu Asp
 325 330 335
 Ile His Phe Ala Asn Asp Asp Gln
 340

【0085】配列番号：6

配列の長さ：392

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Asp Ser Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser
 100 105 110
 Gly Ser Pro Leu Arg Ala His Glu Gln Phe Leu Glu Val Ile Leu Pro
 115 120 125
 Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn Gly His Tyr Ala
 130 135 140
 Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly Thr Phe Ile Ala
 145 150 155 160

25
 Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr Asn Lys His Val
 165 170 175
 Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys Ala Phe Pro Ser
 180 185 190
 Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe Thr Ala Glu Asn
 195 200 205
 Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile Val Lys Phe Ser
 210 215 220
 Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val Lys Pro Ala Thr
 225 230 235 240
 Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn Ile Thr Val Thr
 245 250 255
 Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp Glu Ser Lys Gly
 260 265 270
 Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr Asp Leu Ser Thr
 275 280 285
 Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu Lys Asn Glu Val
 290 295 300
 Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe Asn Gly Ala Val
 305 310 315 320
 Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln Asn Ile Glu Asp
 325 330 335
 Ile His Phe Ala Asn Asp Asp Gln Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asp
 340 345 350
 Asn Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asn Asn Pro Asp Glu Pro Asn Asn
 355 360 365

 Pro Asp Asn Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asp Asn Gly Asp Asn Asn
 370 375 380
 Asn Ser Asp Asn Pro Asp Ala Ala
 385 390

【0086】配列番号：7

配列の長さ：532

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30
 Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Asp Asp Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45
 Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60
 Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Asp Ser Leu Leu Asp Ser Asp Leu Pro
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser
 100 105 110
 Gly Ser Pro Leu Arg Ala His Glu Gln Phe Leu Glu Val Ile Leu Pro

27	115	120	125	28
Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn Gly His Tyr Ala				
130	135	140		
Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly Thr Phe Ile Ala				
145	150	155	160	
Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr Asn Lys His Val				
165	170	175		
Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys Ala Phe Pro Ser				
180	185	190		
Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe Thr Ala Glu Asn				
195	200	205		
Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile Val Lys Phe Ser				
210	215	220		
Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val Lys Pro Ala Thr				
225	230	235	240	
Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn Ile Thr Val Thr				
245	250	255		
Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp Glu Ser Lys Gly				
260	265	270		
Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr Asp Leu Ser Thr				
275	280	285		
Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu Lys Asn Glu Val				
290	295	300		
Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe Asn Gly Ala Val				
305	310	315	320	
Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln Asn Ile Glu Asp				
325	330	335		
Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg Trp Gly Arg Ser Gly Ser Pro Leu				
340	345	350		
Arg Ala His Glu Gln Phe Leu Glu Cys Gly Asn Gly Lys Thr Ala Phe				
355	360	365		
Gln Val Leu Glu Glu Tyr Pro Asp Ser Gly Glu Asn Ile Val Asp Ala				
370	375	380		
Leu Ala Val Phe Leu Arg Leu His Ser Ile Pro Val Cys Asn Cys				
385	390	395	400	
Pro Phe Asn Ser Asp Arg Val Phe Arg Leu Ala Gln Ala Gln Ser Arg				
405	410	415		
Met Asn Asn Gly Leu Val Asp Ala Ser Asp Phe Asp Asp Glu Arg Asn				
420	425	430		
Gly Trp Pro Val Glu Gln Val Trp Lys Glu Met His Lys Leu Leu Pro				
435	440	445		
Phe Ser Pro Asp Ser Val Val Thr His Gly Asp Phe Ser Leu Asp Asn				
450	455	460		
Leu Ile Phe Asp Glu Gly Lys Leu Ile Gly Gly Ile Asp Val Gly Arg				
465	470	475	480	
Val Gly Ile Ala Asp Arg Tyr Gln Asp Leu Ala Ile Leu Trp Asn Cys				
485	490	495		
Leu Gly Glu Phe Ser Pro Ser Leu Gln Lys Arg Leu Phe Gln Lys Tyr				
500	505	510		

29

30

Gly Ile Asp Asn Pro Asp Met Asn Lys Leu Gln Phe His Leu Met Leu
 515 520 525
 Asp Glu Phe Phe
 530

【0087】配列番号：8 *鎖の数：単鎖
 配列の長さ：30 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 * 配列の種類：合成DNA

配列
 ATCGTTGGCC ATATGGATAT CTTCAATATT 30

【0088】配列番号：9 10 ※鎖の数：単鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ※ 配列の種類：合成DNA

配列
 GACTTATTGG TCATCGAGCT CAAAATGGAT ATC 33

【0089】配列番号：10 ★鎖の数：単鎖
 配列の長さ：30 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ★ 配列の種類：合成DNA

配列
 GACTTATTGG TCGAGCTCGG CAAAATGGAT 30

【0090】配列番号：11 20 ☆鎖の数：単鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ☆ 配列の種類：合成DNA

配列
 ATCTGGGTTG AGCTCATCGT TGGCAAAATG GAT 33

【0091】配列番号：12 ◆鎖の数：単鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ◆ 配列の種類：合成DNA

配列
 ATCTGGTGG AGCTCTTGGT CATCGTTGGC AAA 33

【0092】配列番号：13 30 *鎖の数：単鎖
 配列の長さ：34 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 * 配列の種類：合成DNA

配列
 ACAAATCAT ATGGAACGCC TATATCGCCG ACAT 34

【0093】配列番号：14 ※鎖の数：単鎖
 配列の長さ：33 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ※ 配列の種類：合成DNA

配列
 AATATTGAAG AGCTCCGCCT ATATCGCCG CAT 33

【0094】配列番号：15 40 ★鎖の数：単鎖
 配列の長さ：27 トポロジー：直鎖状
 配列の型：核酸 ★ 配列の種類：合成DNA

配列
 GAATGGCAAA AGCTTATGCA TTTCITT 27

【0095】配列番号：16 トポロジー：直鎖状
 配列の長さ：12 配列の種類：ポリペプチド
 配列の型：アミノ酸

配列
 Asn Ile Glu Asp Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg

5

10

31

32

【0096】配列番号：17

配列の長さ：16

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

*

配列

Asn Ile Glu Asp Ile His Met Glu Arg Leu Tyr Arg Arg His His Arg
 5 10 15

【0097】配列番号：18

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

※

配列

Asn Ile Glu Asp Ile His Phe Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His His
 5 10 15

Arg

【0098】配列番号：19

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

★トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

★

配列

Asn Ile Glu Asp Ile His Phe Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Arg Arg His
 5 10 15

His Arg

【0099】配列番号：20

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

☆トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

☆

配列

Asn Ile Glu Asp Ile His Phe Ala Asn Asp Glu Leu Arg Leu Tyr Arg
 5 10 15

Arg His His Arg

20

【0100】配列番号：21

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

◆トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：ポリペプチド

◆

配列

Asn Ile Glu Asp Ile His Phe Ala Asn Asp Asp Gln Glu Leu Arg Leu
 5 10 15

Tyr Arg Arg His His Arg

20

【0101】配列番号：22

配列の長さ：213

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

配列

Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn
 1 5 10 15

Gly His Tyr Ala Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly
 20 25 30

Thr Phe Ile Ala Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr
 35 40 45

Asn Lys His Val Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys
 50 55 60

Ala Phe Pro Ser Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe
 65 70 75 80

33 34
 Thr Ala Glu Asn Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile
 85 90 95
 Val Lys Phe Ser Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val
 100 105 110
 Lys Pro Ala Thr Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn
 115 120 125
 Ile Thr Val Thr Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp
 130 135 140
 Glu Ser Lys Gly Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Thr Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu
 165 170 175
 Lys Asn Glu Val Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe
 180 185 190
 Asn Gly Ala Val Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln
 195 200 205
 Asn Ile Glu Asp Ile
 210

【0102】配列番号：23

20 トポロジー：直鎖状

配列の長さ：214

配列の種類：ポリペプチド

配列の型：アミノ酸

配列

Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn
 1 5 10 15
 Gly His Tyr Ala Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly
 20 25 30
 Thr Phe Ile Ala Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr
 35 40 45
 Asn Lys His Val Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ala Phe Pro Ser Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe
 65 70 75 80
 Thr Ala Glu Asn Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile
 85 90 95
 Val Lys Phe Ser Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val
 100 105 110
 Lys Pro Ala Thr Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn
 115 120 125
 Ile Thr Val Thr Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp
 130 135 140
 Glu Ser Lys Gly Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr
 145 150 155 160
 Asp Leu Ser Thr Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu
 165 170 175
 Lys Asn Glu Val Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe
 180 185 190
 Asn Gly Ala Val Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln
 195 200 205
 Asn Ile Glu Asp Ile His

35
210

36

【0103】配列番号：24

配列の長さ：215

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ポリペプチド

*

配列

```

Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn
 1           5           10           15
Gly His Tyr Ala Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly
          20           25           30
Thr Phe Ile Ala Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr
          35           40           45
Asn Lys His Val Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys
          50           55           60
Ala Phe Pro Ser Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe
          65           70           75           80
Thr Ala Glu Asn Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile
          85           90           95
Val Lys Phe Ser Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val
          100          105          110
Lys Pro Ala Thr Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn
          115          120          125
Ile Thr Val Thr Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp
          130          135          140
Glu Ser Lys Gly Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr
          145          150          155          160
Asp Leu Ser Thr Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu
          165          170          175
Lys Asn Glu Val Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe
          180          185          190
Asn Gly Ala Val Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln
          195          200          205
Asn Ile Glu Asp Ile His Phe
          210          215

```

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) V8プロテアーゼ遺伝子の構成 (a)、及び本発明の遺伝子のクローニングに用いたPCR用プライマーの塩基配列 (b) を示す図である。

【図2】図2は、pG97S4DhCT [G] R6 及びpG97S4DhCT [G] R10の作製過程を示す図である。

【図3】図3は、プラスミドpV8RPT (+) 及びpV8RPT (-) の作製過程を示す図である。

【図4】図4はプラスミドpV8RPT (+) 及びpV8RPT (-) 中にコードされている融合蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。

【図5】図5は、プラスミドpV8Dの作製過程を示す図である。

【図6】図6は、プラスミドpV8D中にコードされている融合蛋白質のアミノ酸配列を示す図である。

【図7】図7は、本発明の融合蛋白質が封入体を形成し

て不溶性画分に移行することを示す電気泳動図であり、図面に代る写真である。

【図8】図8は、V8D 融合蛋白質が、宿主由来のプロテアーゼompTにより開裂されてV8プロテアーゼを遊離させることを示す電気泳動図であって、図面に代る写真である。

40 【図9】図9は、ompTプロテアーゼにより遊離したV8プロテアーゼのリフォoldingを示す電気泳動図であり、図面に代る写真である。

【図10】図10は、ヒトカルシトニン前駆体を含む融合蛋白質を、本発明の方法により得た組換えV8プロテアーゼ (A) 又はS. アウレウスからのV8プロテアーゼ (B) により切断した場合の生成物を比較したチャート図である。

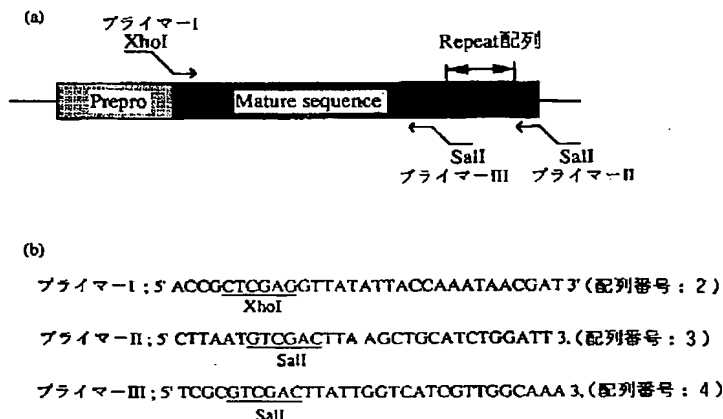
【図11】図11は、種々の融合蛋白質をコードするDNAを含むプラスミド (pV8H, pV8F, pV8A, pV8D2 及びpV8Q) の作製において使用したプライマーの塩基配列を示

す図である。

【図12】図12は、プラスミドpV8H, pV8F, pV8A, pV8D2 及びpV8Qの作製の過程を示す図である。

【図13】図13は、プラスミドpV8D, pV8H, pV8F, pV8A, pV8D2 及びpV8Q中にコードされているV8プロテア

【图 1】



Staphylococcus aureus V8プロテアーゼ遺伝子の構成と
合成プライマーの配列およびアニーリング部位

【图4】

(a) 1
MTMTTDSLAVVLQRRDWENPGVTQLNKLAAIHPIFASWRNSDDARTDRPSQ
100
QLRSLNGEWRFAWFPAPAYPDSLLDSQLEADTVVPSNWQMIGYDAEL
150
RLYKRHHRWGRSGSLPRAHEOFLVILPNDRHODTITNGHYAPVTIO
200
VEAPTGTGFIASIKYVYKGDJLLINKHYVDATIGHDFHALKAIPSAINODNYP
250
NGGTAENTIKSYSGEGDLAIWKISPEONKILIDEEVYKATMSNNAETOVH
300
ONITVTGYPGDKPYVATMWESKCKTTLKGEAMQYDLSTTGGNSQSPVNE
344
KNEYIGHWGGYPNEFGAYETINENYRNFLLKONIEDIIEANDQ (配列番号: 5)

pV8RPT (-) にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列
(下線部はV8プロテアーゼ部分の配列)

[illegible]

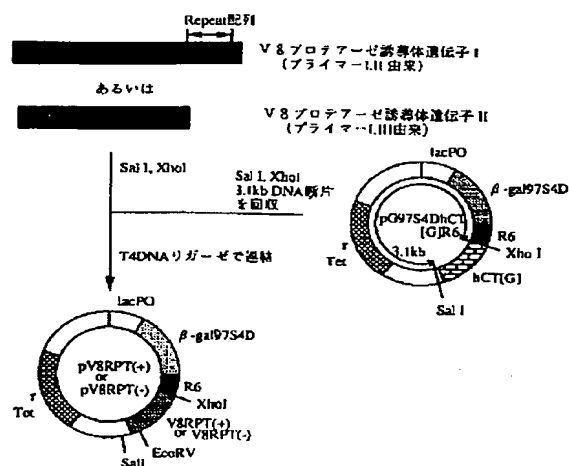
DVGRPT (+) にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列
(下線部はV8プロテアーゼ部分の配列)

pV8RPT (-) 及び pV8RPT (+) にコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列

一ゼのC-末端アミノ酸配列、及び各プラスミドの発現生成物（融合蛋白質）による封入体の形成の有無を表示した図である。

【図 14】図 14 は本発明の方法により製造される目的ポリペプチドのアミノ酸配列の例を示す。

【图3】



pV8RPT(+)および**pV8RPT(-)**の作製方法

【图 6】

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50

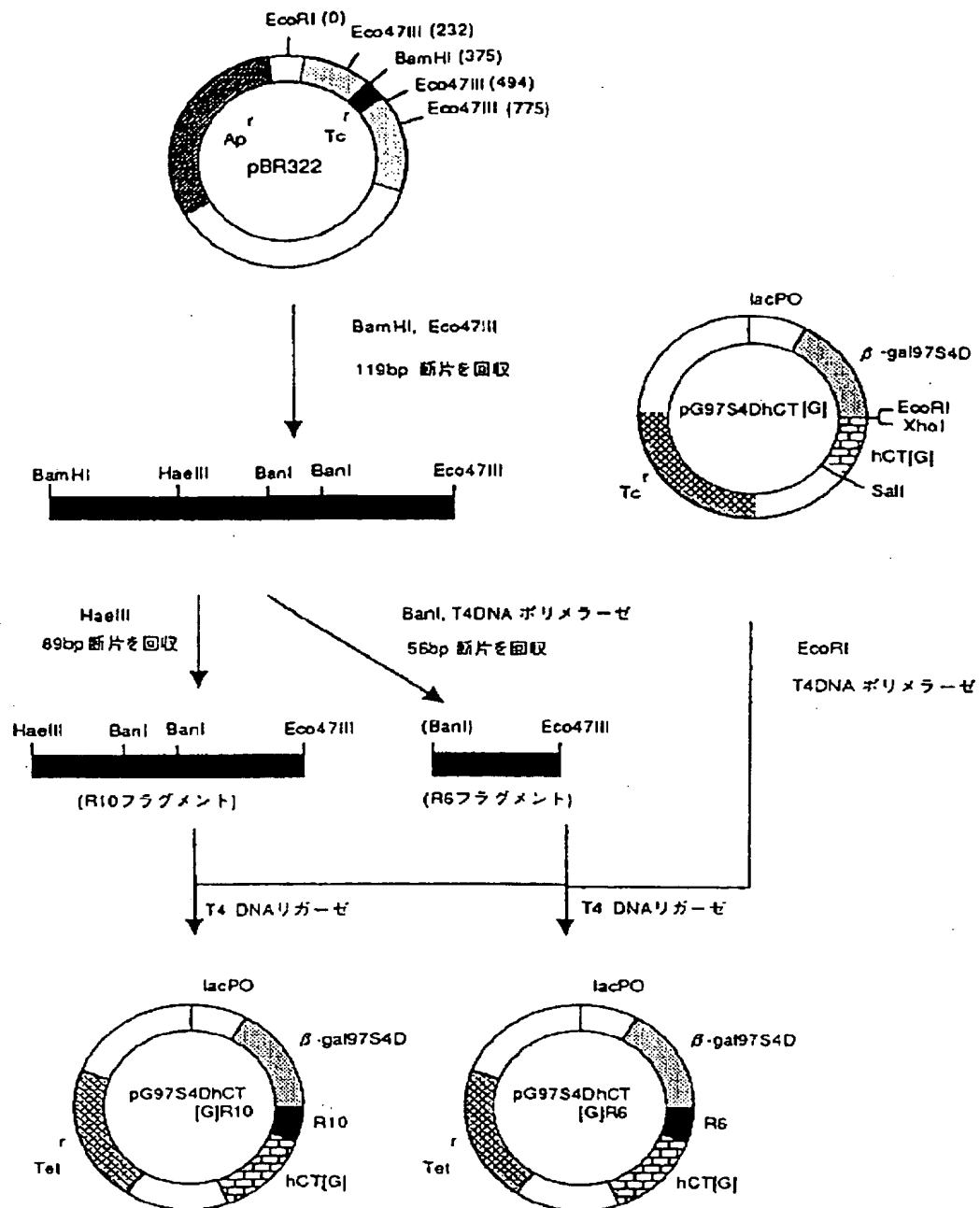
MTMITDLSLAVVLQRRDWENPGVTLQNLRAAHPPFASWRNSDDARTDRPSQ
100
QLRSLNGEWRFAWFPAPAEVPSDLLDSDLPEADTVVPSNWQMHGQYDAEL
150
↓
RLRYRRHHRWGRSGSPRLAHEQFLEVLPNDRHQHQTDTTNGHYAPVITYK
200
YEAPITGTFIASGVVVGKDTLLTNKHVVVDATHGDPHALKAPFSAINODNYP
250
NGGFTAENITKYSGEGDLAIVKESFNEQNKHIGEVVKPATMSNNAETOVN
300
QNTIVTGYPGDKPVATMWESGKKITYLKGEAMOYDLSTTGNSGSPYPNE
350
↓
KNEVIGIHWWGGYPNEENGAVFINENVRNFLKONIEDRLYRRHHRWGRSGS
400
PLRAHEQFLECGNGKTAFAQVLEEYPDSGENIVDALAVFLRRLHSIPVCNC
450
PFNSDRVFLRLAAQASRMNNGVLVDA SDFDDERNGWPVEQVWKEMHKLLPFS
500
PDSVVTHGD FSLDNLFDEGKLGICDVGRVGIADRYQDLAILWNCLEGF
532
SPSLQKRLFPQKYGIDNPD MNKLOFHLMLDEFF (配列番号: 7)

pV8Dにコードされた融合蛋白質のアミノ酸配列

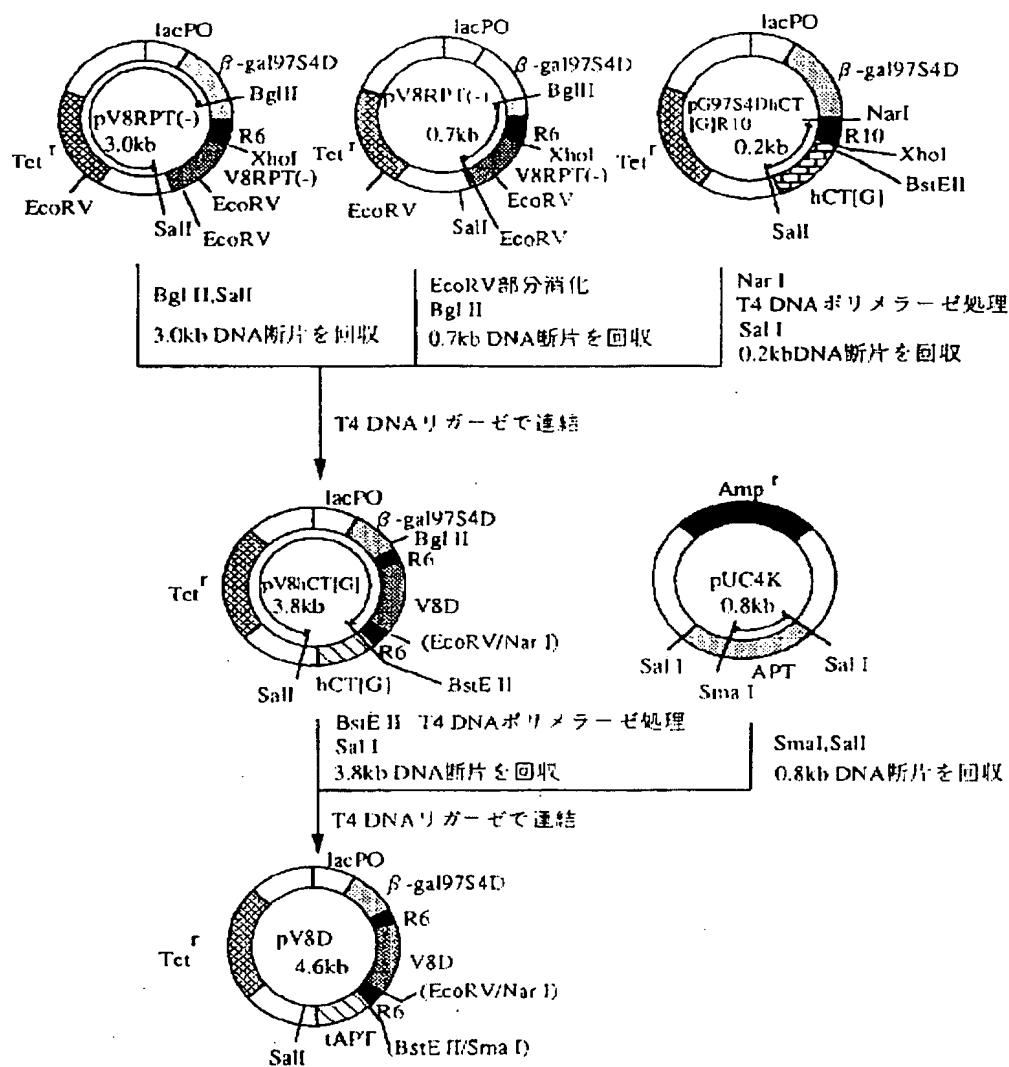
下線部はV8プロテアーゼ部分の配列

↓はOmpTプロテアーゼにより切断される部位

【図 2】



【図 5】

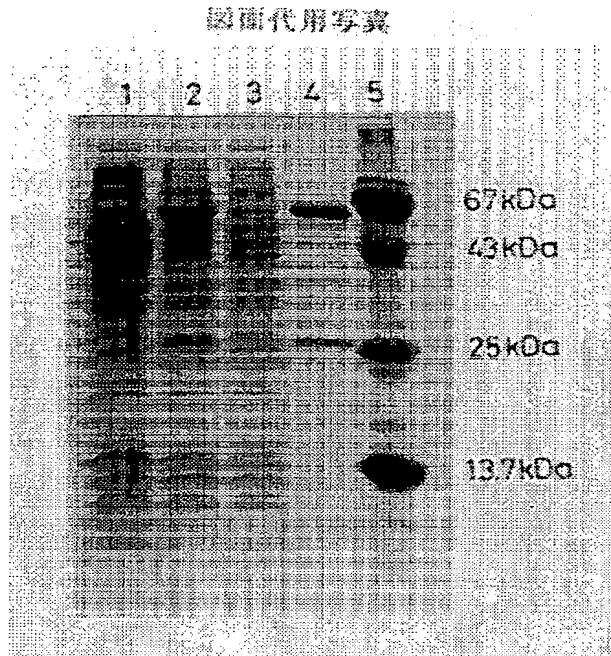


APT; aminoglycoside 3'-phosphotransferase

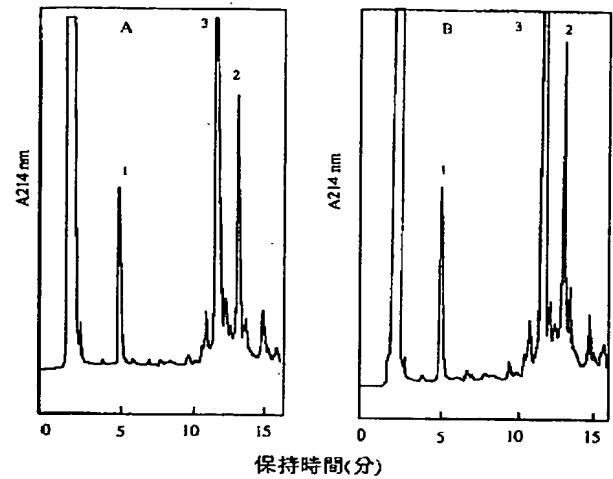
tAPT; truncated aminoglycoside 3'-phosphotransferase

pV8Dの作製方法

【図7】



【図10】



組換えV8プロテアーゼ(V8D)及び*S.aureus* V8プロテアーゼによるヒトカルシトニン前駆体(hCT[G])融合蛋白質の切断

A. 組換えV8プロテアーゼ(V8D) B. *S.aureus* V8プロテアーゼ

ピーク1. hCT[G]

ピーク2. ヒトカルシトニン前駆体(hCT[G])融合蛋白質

ピーク3. β -ガラクトシダーゼ誘導体

V8D融合蛋白質の発現

1. 誘導前の総蛋白質
2. 誘導後の総蛋白質
3. 誘導後の可溶性画分の蛋白質
4. 誘導後の不溶性画分の蛋白質
5. 分子量マーカー

【図11】

プライマー-a: 5' ATCGTTGGCCATATGGATATCTCAATATT (配列番号: 8)
 NdeI

プライマー-b: 5' GACTTATTGGTCATCGAGCTCAAAATGGATATC (配列番号: 9)
 SacI

プライマー-c: 5' GACTTATTGGTCGAGCTCGGCAAAATGGAT (配列番号: 10)
 SacI

プライマー-d: 5' ATCTGGGTTGAGCTCATCGTTGGCAAAATGGAT (配列番号: 11)
 SacI

プライマー-e: 5' ATCTGGTGGAGCTCTTGGTCATCGTTGGCAAA (配列番号: 12)
 SacI

プライマー-f: 5' ACAAATCATATGGAACGCCTATATCGCCGACAT (配列番号: 13)
 NdeI

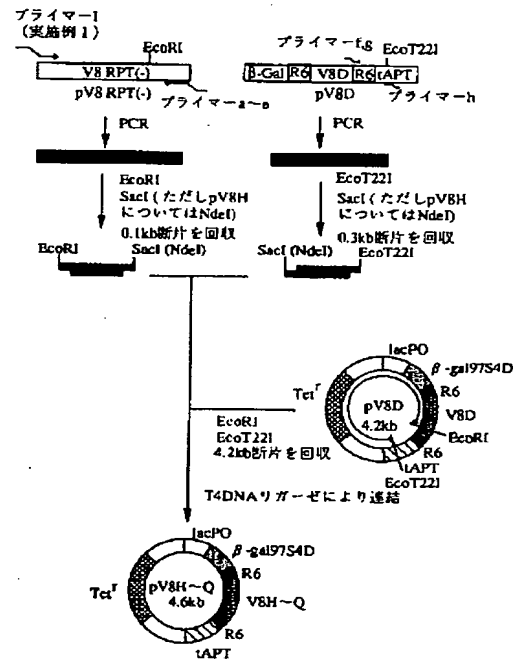
プライマー-g: 5' AATATTGAAGAGCTCCGCTATATGCGGACAT (配列番号: 14)
 SacI

プライマー-h: 5' GAATGGCAAAAGCTTATGCAATTTCTT (配列番号: 15)
 EcoT22I

プライマー-a-hの配列

プライマー-a-hはV8プロテアーゼ遺伝子に対応するプライマー、
 プライマー-f,gはR6配列遺伝子に対応するプライマー、
 プライマー-hはアミノグルコシド3'ホスホトランスフェラーゼ遺伝子
 に対応するプライマーである。

【図12】

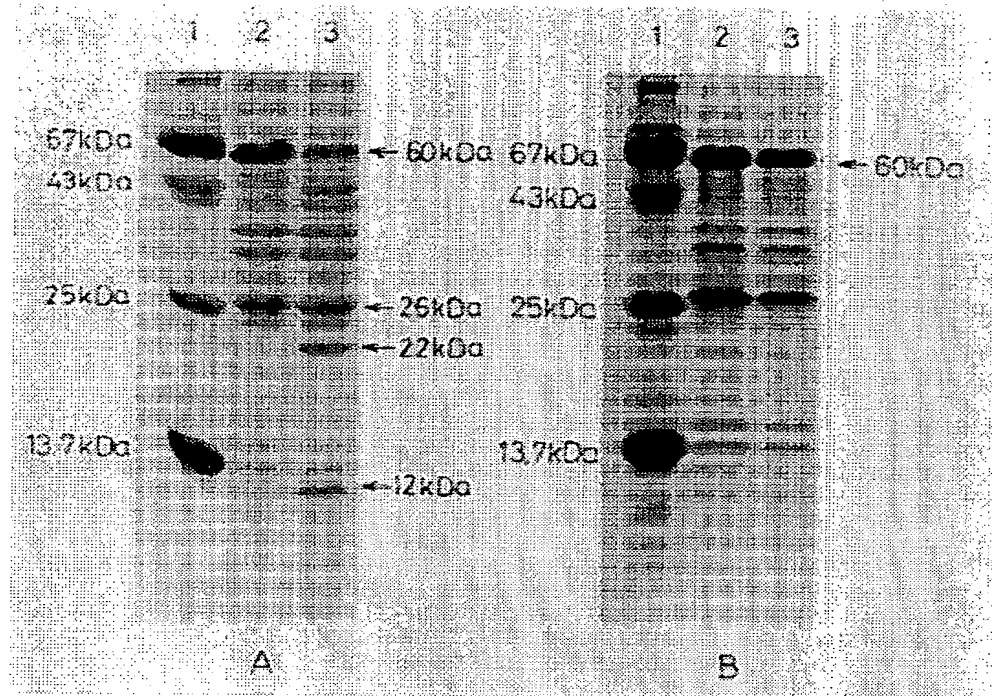


tAPT; truncated aminoglycoside 3'-phosphotransferase

pV8H, pV8F, pV8A, pV8D2およびpV8Qの作製

【図 8】

図面代用写真



ompTプロテアーゼによるVSD融合蛋白質のプロセッシング

A. JM101由来の封入体を使用したもの

B. W3110 M25 (ompT)由来の封入体を使用したもの

1. 分子量マーカー, 2. 尿素溶解直後の試料, 3. 2時間加温後の試料

【図 13】

プラスミド	V8プロテアーゼ部分の C末端配列	封入体形成の有無
	209	
pV8D	---NIED-RLYRRHHR---	+ (配列番号: 16)
pV8H	---NIEDIH-MERLYRRHHR---	+ (配列番号: 17)
pV8P	---NIEDIHE-ELRLYRRHHR---	+ (配列番号: 18)
pV8A	---NIEDIHEA-ELRLYRRHHR---	- (配列番号: 19)
pV8D2	---NIEDIHFAFD-ELRLYRRHHR---	- (配列番号: 20)
pV8Q	---NIEDIHFANDQ-ELRLYRRHHR---	- (配列番号: 21)

+- は封入体形成の有無に対応する。

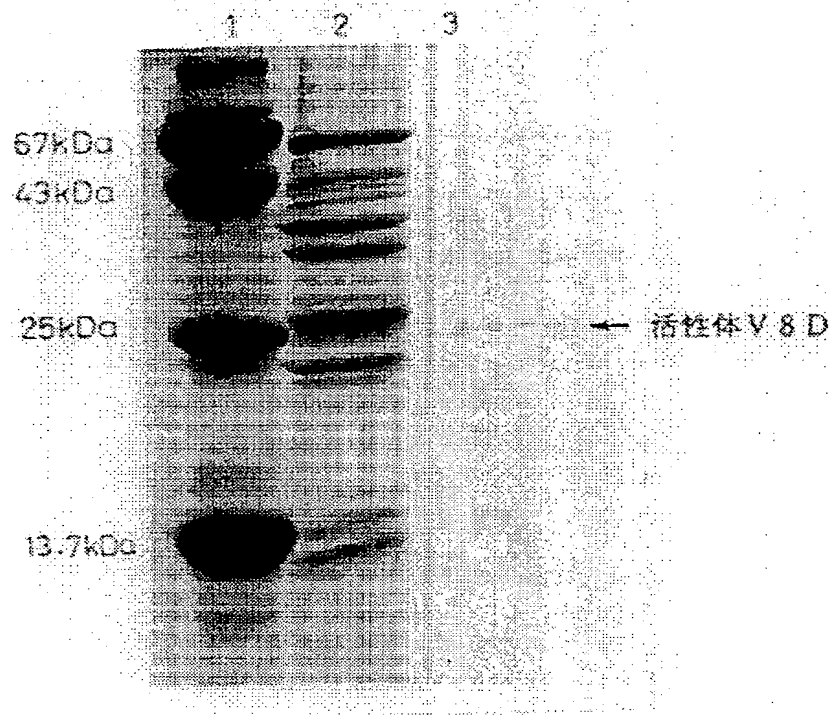
NIEDIHE は V8 プロテアーゼ由来のアミノ酸配列

(成熟体の V8 プロテアーゼの N 末端から 209 番目の Asn(N) より記載した)

V8 プロテアーゼ部の C 末端側の伸長と封入体形成の関係

【図9】

図面代用写真



1. 分子量マーカー
2. ompTプロテアーゼ処理後
3. リフォールディング操作後

リフォールディング操作前後の16% SDS-PAGE

【図 14】

- (a) 50
VILPNNDRHQITDTTNGHYAPVTYIQVEAPIGTFTIASGVVVGKDTLLTNK
100
HVV DATHGDPHALKAFPSAINQDNYPNGGFTAENITKYSOEGDLAIVKFS
150
PNEQNKHIGEVVKPATMSNNAETQVNQNIIVTGYPGDKPVATMWESKGKI
200
TYLKGEAMQYDLSTTGNSGSPVFNEKNEVIGIHWGGVPNEFNGAVFINE
213
NVRNFLKQNIEDI (配列番号: 22)
- (b) 50
VILPNNDRHQITDTTNGHYAPVTYIQVEAPIGTFTIASGVVVGKDTLLTNK
100
HVV DATHGDPHALKAFPSAINQDNYPNGGFTAENITKYSOEGDLAIVKFS
150
PNEQNKHIGEVVKPATMSNNAETQVNQNIIVTGYPGDKPVATMWESKGKI
200
TYLKGEAMQYDLSTTGNSGSPVFNEKNEVIGIHWGGVPNEFNGAVFINE
214
NVRNFLKQNIEDIH (配列番号: 23)
- (c) 50
VILPNNDRHQITDTTNGHYAPVTYIQVEAPIGTFTIASGVVVGKDTLLTNK
100
HVV DATHGDPHALKAFPSAINQDNYPNGGFTAENITKYSOEGDLAIVKFS
150
PNEQNKHIGEVVKPATMSNNAETQVNQNIIVTOYPGDKPVATMWESKGKI
200
TYLKGEAMQYDLSTTGNSGSPVFNEKNEVIGIHWGGVPNEFNGAVFINE
215
NVRNFLKQNIEDIHF (配列番号: 24)

V 8 プロナアーゼ誘導体のアミノ酸配列

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
//(C 1 2 P 21/02	C			
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 9/52				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 1 2 R 1:445)				
			C 1 2 R 1:445)	